



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

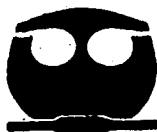
REGULACIÓN DEL GEN DE LA PROLACTINA EN  
LINFOCITOS NORMALES Y DE PACIENTES CON  
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANEL LARA ZAVALA



México, D.F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Rosario Adelaida Muñoz Clares
Vocal	Patricia Elvira Berrón Ruiz
Secretario	Isabel Cristina Méndez Hernández
1er. Suplente	Javier Plasencia de la Parra
2º. Suplente	María Esther de la Rosa Duque

Sitio de realización de la tesis:

Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Asesor:



---

Q.F.B. Isabel C. Méndez Hernández

Sustentante:



---

Anel Lara Zavala

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la Dirección de la Q.F.B. Isabel C. Méndez Hernández, y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el número de proyecto: 31049-M

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A la Q.F.B. Isabel Méndez Hernández, por su asesoría y enseñanzas durante la elaboración del presente trabajo de tesis, por su paciencia y confianza.

Al Dr. Fernando Larrea como un testimonio de agradecimiento, por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio quienes participaron de alguna u otra forma en la realización de esta tesis y estimularon mi superación personal y profesional, por su apoyo y amistad, especialmente a la M. en C. Rocío García Becerra.

A mi querida Facultad de Química

Y a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me brindó el espacio y la oportunidad de egresar como profesionista.

## **DEDICATORIAS**

---

**A mis queridos padres Ernesto Lara y Teresa Zavala por todo el apoyo, confianza y cariño que siempre me han demostrado.**

**A mi abuelita Julia† gracias por todo el amor y las enseñanzas que me brindo “siempre estará conmigo”.**

**A mis hermanos Samuel, Rosalina y Guillermina para que nunca pierdan de vista su objetivo y siempre luchen por lograr las metas que se propongan.**

**A las personas que dudaron que este sueño podía ser realidad.**

**A todos aquellos que hicieron más agradable la vida en la Facultad.**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
GENERALIDADES DE LA PROLACTINA (PRL).....	5
EL GEN DE LA PROLACTINA.....	6
REGULACIÓN DE LA PROLACTINA.....	9
LA PRL Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	11
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
1) SUJETOS.....	17
2) MÉTODOS.....	17
I) Cultivo de células mononucleares (CMN).....	17
II) Determinación de la secreción de PRL linfocitaria.....	18
Bioensayo Nb2.....	18
III) Determinación de la expresión del RNAm de la PRL.....	19
a) Extracción de RNA total.....	19
b) Obtención de la sonda purificada.....	20
b1) Transformación de bacterias competentes por el método de CaCl <sub>2</sub> .....	21
b2) Minipreparación de los plásmidos.....	23
b3) Midipreparación de los plásmidos.....	23
c) Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	24
d) Electroforesis en gel de agarosa y transferencia por capilaridad.....	26
e) Southern blot.....	27
e1) Síntesis de la sonda de prolactina- digoxigenina (PRL-DIG).....	27
e2) Reconocimiento del DNAc de PRL mediante hibridación y detección inmunológica.....	28

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO pBR322-hPRL Y LA SONDA PURIFICADA DE PRL.....	30
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS GRUPOS CONTROL Y CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG).....	32
SECRECIÓN DE LA PRL POR LAS CMN CON Y SIN ESTÍMULO DE CONCAVALINA A.....	33
SECRECIÓN DE LA PRL POR LAS CMN EN RESPUESTA A METOCLOPRAMIDA.....	33
EXPRESIÓN DEL RNA <sub>m</sub> DE LA PRL EN CMN DEL GRUPO CONTROL Y DEL GRUPO CON LEG.....	36
EXPRESIÓN DEL RNA <sub>m</sub> DE LA PRL EN CMN EN RESPUESTA A LA METOCLOPRAMIDA.....	36
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>55</b>



## RESUMEN

---

La prolactina (PRL) es una hormona de origen principalmente hipofisario que también es sintetizada y secretada por las células mononucleares (CMN). Funcionalmente, la PRL se ha reconocido como una citocina, ya que, además de ser sintetizada por las células del sistema inmunológico, contribuye a los efectos de proliferación y a la síntesis de linfocinas y sus receptores en las células del sistema inmunológico. En la hipófisis, la síntesis y secreción de PRL es regulada negativamente por la dopamina hipotalámica. Sin embargo, los mecanismos que regulan su síntesis a nivel linfocitario aún no se han establecido. La presencia de receptores de tipo D3 y D5 de la dopamina en la membrana de los linfocitos, y la síntesis de algunas catecolaminas como la dopamina en estas mismas células (Bergquist J, et al 1994), sugiere mecanismos de regulación autocrina sobre la síntesis de la PRL. Por otra parte, existe un modelo interesante en el que la secreción de la PRL linfocitaria está aumentada, el lupus eritematoso generalizado (LEG). Estudios previos han informado que sujetos que cursan con esta enfermedad autoinmune presentan concentraciones disminuidas de los metabolitos de la dopamina, sugiriendo una desregulación a nivel neuroendocrino que pudiera alterar las concentraciones de la PRL periférica y su síntesis a nivel linfocitario. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación de la expresión del gen de la prolactina en linfocitos normales (grupo control) y de pacientes con LEG posterior a la administración *in vivo* de un agente antagonista dopaminérgico, la metoclopramida. Los resultados del presente estudio demostraron que tanto la secreción como la expresión del gen de la PRL linfocitaria aumentaron posterior a la administración *in vivo* de la metoclopramida sólo en el grupo control, no así en el grupo con LEG. En conclusión, tanto la secreción de la PRL de origen linfocitario

como la expresión del gen se encuentran regulados por el sistema dopaminérgico y esta regulación está alterada en el LEG.

## GENERALIDADES DE LA PROLACTINA

La prolactina (PRL) es una hormona proteínica, sintetizada y secretada principalmente en los lactotropos hipofisarios (células acidófilas de la hipófisis anterior). La PRL es una hormona con múltiples funciones y a través de su interacción con receptores específicos localizados en la superficie de las células blanco ejerce una importante variedad de efectos biológicos. Actualmente, se conocen más de 300 acciones biológicas de la PRL que incluyen no sólo su participación en el área reproductiva o la lactancia, sino también en la homeostasis del organismo (Freeman ME et al, 2000). Las numerosas funciones y efectos de la PRL en diferentes sistemas vivos, incluyendo al humano, pueden ser clasificadas en las siguientes seis categorías: la reproducción, el crecimiento y desarrollo, el balance de líquidos y electrolitos, la inmunorregulación, la conducta y el metabolismo (Larrea F et al, 1993). La PRL, además de la glándula hipofisaria, es sintetizada y secretada ampliamente en diferentes sitios del organismo: el hipotálamo, el miometrio uterino, la decidua placentaria, la glándula mamaria, la glándula adrenal, la próstata, la glándula uretral, los islotes pancreáticos y en las células del sistema inmunológico (Sinha YN, 1995).

Estudios recientes indican que la PRL tiene un importante papel modulador en el sistema inmunológico y sugieren su influencia en algunas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG) (Jara LJ et al, 1992). Sin embargo, el origen de elevadas concentraciones de la PRL en el suero en pacientes con LEG aún no se ha dilucidado (Montgomery D, 2001). Adicionalmente, la expresión del RNAm de PRL en diferentes órganos del sistema

inmunológico ha generado gran interés, debido al posible papel que puede desempeñar la PRL en la patología de estas enfermedades.

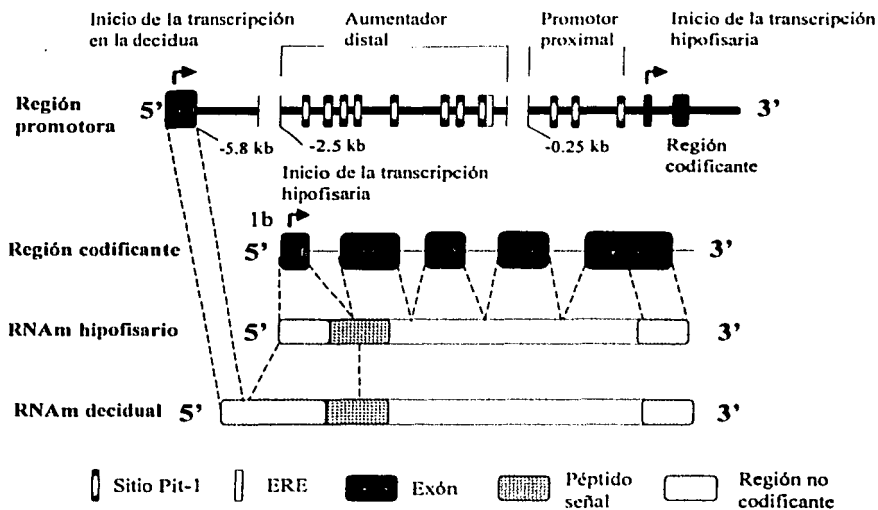
## **EL GEN DE LA PROLACTINA**

La PRL, por su estructura, sus propiedades de unión a receptores y sus propiedades genéticas y funcionales, pertenece a una familia de hormonas proteínicas conformada por la PRL, la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario. Los genes que codifican para estas tres hormonas provienen de un gen ancestral común y aparecieron probablemente como consecuencia de un mecanismo de duplicación genética (Cooke NE et al, 1981).

El gen que codifica la síntesis de la PRL se localiza en el brazo corto (p23-p21.1) del cromosoma 6 (Owerbach D et al, 1981) y contiene en su estructura 914 pares de bases (pb). Este gen ocupa aproximadamente 10 kb del genoma y consiste estructuralmente de cinco exones y cuatro intrones. El primer exón se encuentra constituido por una región 5' no codificante de 56 pb y por otra codificante de 28 pb (Figura 1). El resto de la porción del gen contiene el segundo (176 pb), el tercero (108 pb), el cuarto (180 pb) y el quinto exón (189 pb), incluyendo una región 3' no codificante (Truong AT et al, 1984).

En tejidos extrahipofisarios, como la decidua, el miometrio y las células del sistema inmunológico, existe un exón adicional, el exón 1a, localizado en la región 5' no codificante (Figura 1). El exón 1a no codificante presenta un sitio de inicio transcripcional 5.8 kb hacia el extremo 5' (Berwaer M et al, 1994), a partir del inicio de la transcripción hipofisaria y sufre empalmes alternativos con el primer exón hipofisario (exón 1). Estos empalmes generan un transcrito de

aproximadamente 134 pb más largo que el hipofisario. Estas variantes en los transcritos difieren únicamente en el tamaño de la región 5' no codificante y por lo tanto sus productos de traducción son idénticos a la PRL hipofisaria (Figura 1) (Nira BJ et al, 1996).



**Figura 1. Diagrama del gen y del RNAm de la PRL.** El promotor de la PRL presenta 3 regiones reguladoras: 1) una región proximal con 3 sitios de unión para Pit-1, 2) una región distal con 8 sitios de unión para Pit-1 y una secuencia elemento de respuesta a estrógenos (ERE) y 3) una región superdistal (de -3.5 a -6 kb). En tejidos extrahipofisarios utiliza un promotor alternativo con un sitio de inicio de la transcripción localizado 5.8 kb hacia el extremo 5' del sitio de inicio hipofisario (región superdistal). El RNAm en la decidua es aproximadamente 134 pb más largo en la región 5' no codificante.

El gen de la PRL humana presenta 3 regiones de regulación transcripcional: 1) un promotor proximal conformados por 3 sitios de unión para Pit-1 entre +33 y -250 pb, 2) un elemento distal conformado por 8 sitios de unión para Pit-1 entre -1300 y -1800 pb y los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (estas dos regiones son requeridas para la expresión específica del gen de la PRL a nivel hipofisario) y 3) una región promotora superdistal entre -3500 y -6000 pb que regula la expresión del gen de la PRL en tejidos extrahipofisarios (Maurer RA et al, 1990; Nira BJ et al, 1996).

El RNAm es un transcrito de aproximadamente 1 kb y codifica para una prehormona de 227 aminoácidos, que incluye 28 aminoácidos del péptido señal, denominada pre-prolactina. La pre-prolactina es hidrolizada en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, dando origen a una PRL madura de cadena sencilla constituida por 199 aminoácidos y 3 puentes disulfuro con un peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltones (Da). Existen evidencias que sugieren la existencia de variantes de la PRL como producto de empalmes del RNAm que implican la retención de intrones. Sin embargo, ésta no se considera como una de las principales fuentes que dan origen a las isoformas de la PRL (Sinha YN, 1995; Freeman ME et al, 2000). El producto de su síntesis, previo a su secreción, sufre modificaciones postraduccionales como son: la hidrólisis del péptido de señal, la dimerización y polimerización, la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis de la forma nativa (Neill JD et al, 1994; Sinha YN, 1995).

## REGULACIÓN DE LA PROLACTINA

La regulación neuroendócrina de la síntesis y secreción de la PRL hipofisaria está fundamentalmente bajo la inhibición tónica hipotalámica, que es ejercida principalmente por el sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, específicamente por la dopamina. A través del sistema portal hipotálamo-hipofisario la dopamina es transportada para ejercer sus efectos sobre los lactotropos hipofisarios (Nira BJ, 1985; Demaria JE, 2000). Adicionalmente, la PRL por sí misma modifica la actividad dopaminérgica del hipotálamo por un mecanismo de retroalimentación de asa corta (Perkins NA et al, 1979). Por otra parte la PRL regula tanto su síntesis como su liberación por un mecanismo de autorregulación (Devost D et al, 1999).

En la adenohipófisis, la dopamina se une a receptores de membrana D acoplados a proteínas G intracelulares. De esta forma inhibe tanto la síntesis, al reprimir la transcripción del gen de la PRL, como la liberación de ésta, disminuyendo la concentración de AMP cíclico y calcio intracelular. El mecanismo exacto por el cual dopamina inhibe la síntesis de PRL aún no se ha determinado; sin embargo, en cultivos hipofisarios, la adición de la dopamina en los primeros segundos incrementa el intercambio de potasio e inactiva los canales de calcio, resultando en una hiperpolarización de la membrana y disminuyendo el calcio libre intracelular. En los siguientes minutos a horas suprime la actividad de la adenilato ciclasa, el metabolismo del inositol fosfato, la liberación del ácido araquidónico, y la expresión del gen de la PRL. Después de días, la dopamina suprime la proliferación celular (Nira BJ et al, 1996). Paradójicamente, bajas concentraciones de dopamina parecen estimular la liberación de la PRL (Burriss TP et al, 1992).

Existen otros factores de origen hipotalámico que regulan de manera inhibitoria la síntesis y secreción de la PRL hipofisaria, como el ácido  $\gamma$  aminobutírico, la hormona liberadora de gonadotropinas y las endotelinas 1 y 2. A su vez el hipotálamo también contiene otros factores que han sido implicados en la estimulación de la secreción de la PRL hipofisaria tales como la hormona liberadora de tirotrópina, la colecistoquinina, la oxitocina, el péptido vasoactivo intestinal y la neurotensina. Dentro de los factores periféricos que modifican la secreción de la PRL están los productos de síntesis de las células esteroidogénicas del testículo, del ovario y de las glándulas suprarrenales como son los estrógenos (Larrea F et al, 1993). Existen elementos reguladores localizados en la región del promotor de la PRL con funciones tanto de estimulación como de inhibición de la transcripción, de los cuales se ha encontrado que receptores de hormonas esteroides actúan como factores de transcripción uniéndose a los ERE. Además, factores de crecimiento como la insulina (Stanley F et al, 1988) y el factor de crecimiento epidermal (Mundoch GH et al, 1982) estimulan la expresión del gen de la PRL mientras que los factores  $\beta$  transformantes la suprimen (Delidow BC et al, 1991).

La PRL es también secretada mostrando un patrón rítmico de tipo circadiano y sus concentraciones varían de 20 a 25 ng/ml, siendo mayores en mujeres que en hombres. La liberación de la PRL se ve alterada durante la lactancia debido al estímulo del pezón por el lactante mediante el incremento en la síntesis y secreción de la oxitocina. Otros factores externos importantes que alteran la liberación de la PRL son la luz, la audición, el olfato y el estrés (Freeman ME et al, 2000).



## LA PRL Y SISTEMA INMUNOLÓGICO

Además de los bien conocidos efectos de la PRL sobre la función lactogénica y reproductiva (Larrea F et al, 1993; Neill JD et al, 1994; Freeman ME et al, 2000) existen otros, relacionados con el papel modulador de esta hormona sobre el sistema inmunológico.

En años recientes se ha demostrado que la PRL ejerce diversas acciones fisiológicas dentro de las cuales se encuentra el mantener la regulación del sistema inmunológico. La PRL en el sistema inmunológico humano participa como un importante inmunomodulador y puede modificar la maduración, diferenciación y proliferación de los linfocitos (Nira BJ et al, 1996; Matera L, 1996). A este respecto, existen numerosos estudios sobre la relación que existe entre la PRL y el sistema inmunológico que demuestran que: 1) la PRL estimula la expresión de mediadores inmunológicos como la IL-2 y su receptor, entre otras acciones, por lo que funcionalmente ha sido reconocida como una citocina (Murherjee P et al, 1990; Viselli SM et al, 1991), 2) la expresión del RNAm de la PRL en células de timo, bazo, amígdalas, nódulos linfáticos, timomas y linfomas, en estos dos últimos se encuentra muy disperso y parece intervenir en la progresión de tumores (Wu H et al, 1997), 3) los receptores de PRL son expresados en linfocitos B y T, 4) la adición de anticuerpos específicos contra la PRL inhibe la proliferación de los linfocitos en cultivo, lo que sugiere que la PRL puede tener mecanismos de acción autócrinos y parácrinos (Pellegrini I et al, 1992), 5) la hipofisectomía y/o tratamiento con un agente agonista de la dopamina, la bromocriptina, se acompaña de una deficiente respuesta en el sistema inmunológico celular y tumoral que puede ser restaurada por la PRL exógena, lo que sugiere que la PRL hipofisaria modula la función normal de los linfocitos y 6) la PRL estimula la producción de timulina (hormona

tímica), un importante modulador del crecimiento y diferenciación de timocitos (Dardenne M et al, 1989).

Diversas células del sistema inmunológico como el timo, el bazo y las CMN contienen el RNAm de la PRL y secretan una PRL bioactiva de tamaño similar a la hipofisaria. La PRL inmunorreactiva de 22 kDa se ha detectado tanto en las células del sistema inmunológico murino (Montgomery et al, 1990) como humano (Wu H et al, 1996). Además, se han reportado diversas isoformas como la de 11 kDa en timocitos y linfocitos (Montgomery et al, 1992), las de 46 y 48 kDa en esplenocitos (Shah GN et al, 1991; Freeman ME et al, 2000) y la de 60 kDa en células mononucleares (Sabharwal P et al, 1992; Larrea F et al, 1997).

La regulación de la secreción de la PRL a nivel linfocitario, así como su papel en la autoinmunidad aún no han sido determinados; sin embargo, la presencia de receptores para dopamina en la superficie de los linfocitos, sugiere mecanismos de regulación similares a los que ocurren a nivel hipofisario. La caracterización farmacológica de los receptores de dopamina en los linfocitos sugiere la presencia predominante de receptores de tipo D4 y D5 (Santambrogio et al, 1993; Ricci A et al, 1994; Bondy B et al, 1996), más que receptores de tipo D2 localizados en los lactotropos. Sin embargo en linfocitos de rata, se ha determinado la presencia del RNAm de los receptores de tipo D1, D3 y D5 (Caronti B et al, 1998). Por otra parte se ha demostrado que los linfocitos almacenan y sintetizan algunas catecolaminas, específicamente la dopamina, que influye en la función de regulación de estas células de forma autocrina (Bergquist J et al, 1994)

El papel de la PRL en patologías del sistema inmunológico aún no se ha dilucidado. Las evidencias observadas en modelos animales y sustentadas por estudios clínicos

sugieren la influencia de la PRL en el curso de algunas enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), donde existe una correlación entre las concentraciones de PRL y la actividad de la enfermedad (McMurray R, 1991; Elbourne KB et al, 1998). El LEG es una enfermedad crónica, inflamatoria multifactorial con remisiones espontáneas, atribuida en parte a la existencia en el suero de numerosos anticuerpos contra proteínas nucleares y también contra otros componentes de las células. Reportes previos han revelado la secreción aumentada de la PRL por células mononucleares mantenidas en cultivo de mujeres con LEG en comparación con células de mujeres sanas (Gutiérrez MA et al, 1995; Larrea F et al, 1997). Además, diferentes estudios clínicos han reportado la presencia de cantidades elevadas de diversos autoanticuerpos en pacientes con hiperprolactinemia (Jara LJ et al, 1992). Otros autores han descrito concentraciones elevadas de PRL en pacientes con enfermedades autoinmunes y sobre todo en pacientes con LEG en un porcentaje del 2-31% de los casos (Jara LJ et al, 1992; Buskila D et al, 1996; Jimena P et al, 1998). Adicionalmente, estos sujetos presentan mayor producción de PRL linfocitaria, lo que podría contribuir al aumento en las concentraciones circulantes de esta hormona (Sabharwal P et al, 1992; Larrea F et al, 1997). Por otra parte, se ha demostrado la reducción en las concentraciones de PRL en pacientes con LEG mediante terapia con bajas dosis de bromocriptina en los que, además, disminuye la actividad de la enfermedad (Walker SE, 2001). En los pacientes masculinos con LEG, la hiperprolactinemia es un fenómeno común (Lavalle C et al, 1987). En las mujeres, la intensa actividad del LEG se relaciona con periodos de intensa actividad hormonal durante la secreción cíclica y constante de estrógenos y PRL (Compañ-González DA et al, 1996).

Retomando lo antes mencionado, los mecanismos que regulan la síntesis y secreción de PRL a nivel linfocitario aún no se han establecido. Sin embargo, la síntesis de catecolaminas como la dopamina (Bergquist J et al, 1994) y la presencia de receptores para esta molécula en células del sistema inmunológico, sugiere mecanismos de regulación autocrina sobre la síntesis de la PRL a nivel linfocitario (Bondy B et al 1996). Lo anterior aunado a que en el nuestro y otros laboratorios se demostró que en cultivos de células mononucleares de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG), la secreción de la PRL está aumentada (Gutiérrez MA et al, 1995; Larrea F et al, 1997). Por lo cual en el presente trabajo se planteó evaluar la influencia del sistema dopaminérgico en la regulación de la síntesis y secreción de la PRL a nivel inmunológico.

## **HIPÓTESIS**

---

El sistema dopaminérgico tiene influencia tanto en la secreción como en la expresión del gen de la PRL a nivel periférico (linfocitos), de manera similar a lo que ocurre a nivel central (hipotálamo-hipofisario).

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de la expresión del gen de la prolactina por un agente antagonista dopaminérgico en linfocitos normales y de pacientes con lupus eritematoso generalizado.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Valorar la expresión del RNA mensajero de la PRL en células mononucleares de mujeres sanas y con lupus eritematoso generalizado.
- 2) Evaluar la secreción de la PRL por las células mononucleares en respuesta al bloqueo dopaminérgico *in vivo* con metoclopramida en mujeres sanas y con lupus eritematoso generalizado.
- 3) Evaluar la expresión del RNA mensajero de la PRL por las células mononucleares en respuesta al bloqueo dopaminérgico *in vivo* con metoclopramida en mujeres sanas y con lupus eritematoso generalizado.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

## **1) SUJETOS**

El estudio se realizó en dos poblaciones: una conformada por mujeres con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG) y otra por mujeres sanas que conformaron el grupo control. Ambos grupos estuvieron formados por mujeres con ciclos menstruales regulares, sin trastornos endocrinológicos, sin tratamiento hormonal ni inmunosupresor. A las mujeres se les administró por vía oral 10 mg del agente antagonista dopaminérgico metoclopramida, con la finalidad de bloquear *in vivo* el efecto de la dopamina en la síntesis de la prolactina (PRL). Se obtuvieron muestras de sangre venosa al tiempo basal ( $t=0'$ ) y a los 90 minutos ( $t=90'$ ) del estímulo antidopaminérgico, tiempo en el que se ha demostrado que la metoclopramida provoca la respuesta máxima en términos de la liberación de la PRL a la circulación. De estas muestras de sangre se obtuvieron las células mononucleares (CMN).

## **2) MÉTODOS**

### **I. Cultivo de células mononucleares**

Las células mononucleares (CMN) se extrajeron de sangre periférica de la vena antecubital utilizando EDTA al 5%, como agente anticoagulante. Las células se obtuvieron por gradientes de Lymphoprep<sup>TM</sup> (NYCOMED). Las CMN fueron

recuperadas de la interfase, que se lavó dos veces con medio RPMI 1624 (GIBCO/BRL) complementado con L-glutamina y bicarbonato de sodio, pH 7.4, centrifugándose a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio AIM-V® (GIBCO/BRL) libre de sueros, complementado con L-glutamina, 50 µg/mL de sulfato de estreptomina, 10 µg/mL de sulfato de gentamicina, USP. La viabilidad de las células se determinó por tinción vital con azul de tripán, ajustándose a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml de medio AIM-V®. Finalmente, las CMN se incubaron en presencia o ausencia de concavalina A (SIGMA) a una concentración final de 4.0 µl/ml durante 72 h, a 37°C, en una atmósfera con 95% de aire y 5% CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación, las CMN se separaron del medio de cultivo centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos y tanto el medio como las células se congelaron a -70°C hasta su procesamiento.

## **II. Determinación de la secreción de PRL linfocitaria**

En los medios de cultivo de las CMN, se cuantificó la concentración de PRL a través de su capacidad de inducir la proliferación de las células del linfoma Nb2 de la rata (Tanaka et al, 1980).

### **Bioensayo Nb2**

Las células Nb2 fueron detenidas en fase temprana G<sub>0</sub> del ciclo celular, mediante pre-incubación durante 24 h en medio de estación, el cual contenía medio Fisher (GIBCO/BRL), complementado con 10% de suero de caballo, 1% de suero fetal de ternera, solución de β-mercaptoetanol al 6.6%, 10,000U-10mg/ml de penicilina-estreptomina y solución de bicarbonato de sodio al 7.5 %, pH 7.4. Transcurrido el tiempo de pre-incubación, se reinició el ciclo celular estimulando con



concentraciones crecientes de PRL humana hipofisaria altamente purificada (NIDDK hPRL RP-2) que sirvió como curva estándar del ensayo. La PRL humana se diluyó en medio de ensayo, el cual contenía medio Fisher (GIBCO/BRL), complementado con 10% de suero de caballo, solución de  $\beta$ -mercaptoetanol al 6.6%, 10,000U-10mg/ml de penicilina-estreptomicina y solución de bicarbonato de sodio al 7.5 %, pH 7.4. La PRL bioactiva se cuantificó mediante la incubación de las células Nb2 con el medio de cultivo de las CMN durante 72 h, a 37°C, en una atmósfera con 95% de aire y 5% CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación, se determinó la concentración de la PRL secretada por las CMN, por su capacidad de inducir la mitosis y proliferación de las células de linfoma de rata Nb2 utilizando para ello el paquete comercial Cell Proliferation Kit II (XTT, Roche), el cual se basa en un método colorimétrico. Los valores desconocidos se interpolaron sobre las absorbancias dadas por la curva estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística t de student (n=19 controles, n=14 LEG).

### **III. Determinación de la expresión del RNAm de la PRL**

Se valoró la expresión del RNAm de la PRL en las CMN obtenidas. Para esta finalidad se realizaron los siguientes métodos:

#### **a) Extracción de RNA total**

El RNA total se extrajo de las CMN por el método modificado de TRIzol®, que es una solución monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol (GIBCO/BRL) (Chomczynski y Sacchi, 1987). La función del TRIzol® es romper las células y desnaturalizar las nucleasas endógenas, manteniendo la integridad de RNA en la muestra. A las CMN se les adicionó 1 ml de TRIzol® por cada  $5 \times 10^6$  células.

Posteriormente, la adición de cloroformo (se adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol® usado) al extracto celular seguida por la centrifugación de la mezcla generó 3 fases: una fase acuosa o incolora (superior), una interfase blanca y una fase orgánica roja (inferior). A partir de la fase acuosa, el RNA fue recuperado por precipitación con isopropanol (se adicionó 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol® usado), lavado con etanol al 80% (se adicionó 1 ml de EtOH por cada ml de TRIzol® usado) y resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato. Finalmente, el RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría a una  $\lambda=260$  nm y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser procesado en la reacción de RT-PCR.

## **b) Obtención de la sonda de PRL purificada**

Para el desarrollo de este estudio se obtuvo un fragmento de DNA complementario altamente purificado correspondiente a la secuencia de la PRL humana. Este fragmento se utilizó como control positivo en el procesamiento de las muestras por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se generó a partir del plásmido pBR322-hPRL (Cooke y cols, 1981), donado por la Dra. Carmen Clapp del Centro de Neurobiología, UNAM. El plásmido pBR322-hPRL tiene insertado un fragmento de 914 pb del gen de la PRL humana, y contiene el gen de resistencia para tetraciclina (Tc). El DNA insertado en el sitio de restricción para Pst I dentro del gen de resistencia para Amp interfiere con la función de este gen y hace a la bacteria portadora de este plásmido sensible a la ampicilina (Figura 2).

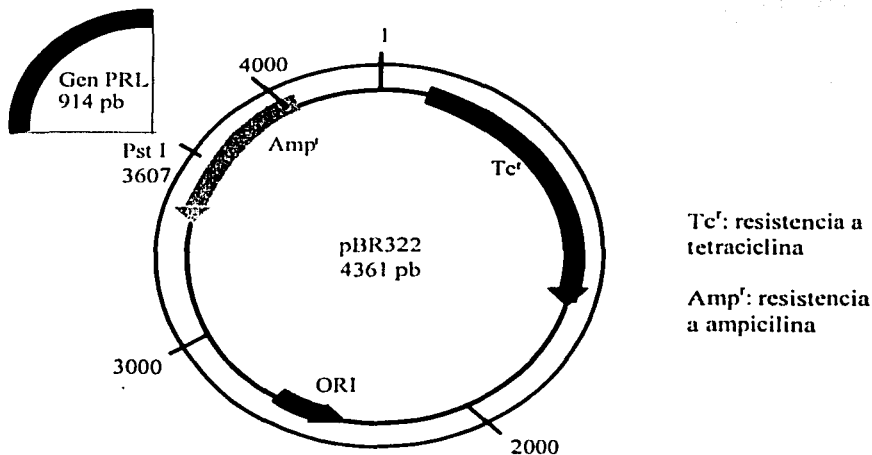


Figura 2. Mapa de restricción del plásmido pBR322. El plásmido pBR322 es una molécula de DNA circular de doble cadena de 4361 pb de largo. El plásmido tiene insertado un fragmento de 914 pb del gen de la PRL humana (pBR322-hPRL) y contiene el gen de resistencia para tetraciclina (Tc). El peso molecular del plásmido pBR322 es de  $2.83 \times 10^6$  Daltones.

### b1) Transformación de bacterias competentes por el método de CaCl<sub>2</sub>

Con el objeto de amplificarlo, el plásmido PBR322-hPRL fue introducido a las bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5α por el método de transformación. Para esta finalidad, se cultivaron bacterias de *Escherichia coli* a 37°C con agitación moderada (300 rpm) durante toda la noche en el medio nutritivo no selectivo Luria Bertani (LB) líquido, pH 7.4. Transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo se diluyó 1/100 en medio LB en un frasco estéril y se incubó nuevamente a 37°C durante 24 h. La densidad celular se monitoreó midiendo la absorbancia ( $\lambda=590$

nm) hasta que alcanzó un valor de 0.375 correspondiente a la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. Las células bacterianas fueron concentradas por centrifugación a 3000 rpm y resuspendidas en solución de  $\text{CaCl}_2$  (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15% v:v glicerol, 10 mM PIPES; pH 7), con la finalidad de hacerlas competentes, es decir, conferirles la capacidad de absorber el DNA plasmídico. Por último, las células bacterianas competentes se congelaron inmediatamente a  $-70^\circ\text{C}$ , en volúmenes de 250  $\mu\text{l}$  para su almacenamiento.

A las células bacterianas competentes se les adicionó 10 ng de DNA plasmídico/25 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  y se dejó reposar en hielo durante 30 min. Posteriormente, las células bacterianas competentes se hicieron permeables al DNA plasmídico por un proceso de desequilibrio térmico, que consistió en poner las células a  $42^\circ\text{C}$  por 45 seg e inmediatamente pasarlas a baño de hielo donde se dejaron 5 min. Posteriormente, a las células bacterianas competentes se les adicionó 1 ml de medio LB y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante durante 1 h para permitir la síntesis del plásmido. Terminada la incubación, las células bacterianas competentes que incorporaron el DNA del plásmido se seleccionaron con base en su crecimiento en presencia de 12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de tetraciclina. Para esta finalidad se sembraron 100  $\mu\text{l}$  del concentrado bacteriano y diluciones 1:2 y 1:5 del mismo concentrado, en medio LB en fase sólida con tetraciclina, donde el plásmido introducido les confiere resistencia y por lo tanto crecen a pesar de la presencia de este antibiótico. Finalmente, las placas del cultivo se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h.

De las células bacterianas transformadas con el DNA de interés se seleccionó una colonia aislada y se cultivó en 5 ml de medio LB líquido, pH 7.4 conteniendo 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tetraciclina a  $37^\circ\text{C}$  con agitación vigorosa durante toda la noche. A estos cultivos en medio líquido se les adicionó glicerol al 15% v:v, con la finalidad de

proporcionarles un ambiente adecuado para su congelación. Se separaron en volúmenes de 1 ml y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para almacenarlos y posteriormente ser utilizados en la purificación de DNA plasmídico con las técnicas mini y midipreparación.

### **b2) Minipreparación de los plásmidos**

Esta técnica se utilizó para purificar y verificar la integridad de pequeñas cantidades de DNA de plásmidos introducidos en las bacterias. Se utilizaron membranas de sílica gel incluidas en el estuche comercial QIAprep® Miniprep siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial QIAGEN Inc. El procedimiento está basado en la lisis alcalina de células bacterianas seguido por la absorción del DNA en sílica, en presencia de un alta concentración de sales. Éste consiste en cuatro pasos básicos: a) preparación y aclaramiento de lisado bacteriano, b) adsorción del DNA en la membrana QIAprep®, c) lavado y elución del DNA plasmídico y d) cuantificación de DNA plasmídico midiendo la absorbancia a una  $\lambda=260$  nm.

### **b3) Midipreparación de los plásmidos**

Esta técnica se utilizó para la purificación de una mayor cantidad de DNA plasmídico a partir de las bacterias transformadas. Se utilizó el estuche comercial QIAfilter® Plasmid Midi siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial QIAGEN Inc. El procedimiento consistió en purificar el DNA plasmídico de proteínas, de impurezas de bajo peso molecular, de DNA bacteriano y de RNA plasmídico. Se utilizó una columna con resina de intercambio iónico, a la que sólo se unió el DNA plasmídico mediante la interacción entre los fosfatos cargados

negativamente del DNA plasmídico y los grupos cargados positivamente del dietilaminoetanol de la superficie de la resina. El DNA se recuperó de la columna por elución con una solución concentrada de sales (1.25 M NaCl, 0.05 M Tris-base, 15% v:v isopropanol) y se precipitó con isopropanol. Se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), obteniendo así un DNA altamente purificado. Finalmente, se cuantificó la cantidad de DNA presente en la muestra midiendo la absorbancia por espectrofotometría a una  $\lambda=260$  nm.

Para verificar la pureza, calidad y el peso de la sonda obtenida, se procedió a la digestión de ésta con 10 U de la enzima de restricción Pst I (*Providencia suartii* GIBCO/BRL), ya que tiene un sitio de restricción para esta enzima. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, en solución amortiguadora de corrida TBE 1X (0.1M ácido bórico, 0.1M Tris base, 1mM EDTA). El número de fragmentos y tamaños del mismo se compararon con el mapa de restricción de acuerdo a la bibliografía (Cooke NE et al, 1981).

### **e) Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

La reacción de retrotranscripción (RT) se realizó debido a que el RNA total extraído de las CMN se obtuvo en pequeñas cantidades, por lo que se sintetizó la 1ª cadena de DNA complementario (DNAc) a partir del RNA mensajero (RNAm). Posteriormente, el DNAc se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1  $\mu$ g de RNA se utilizó como molde para la síntesis del DNAc, mediante el estuche comercial SuperScript™ First-Strand Synthesis System de RT-PCR (GIBCO/BRL).

La reacción de síntesis es catalizada por la enzima Super Script II Rnasa H-Reversa Transcriptasa. Al término de la reacción, se inactivó la enzima adicionando RNAsa H (2 U/ $\mu$ l). El DNAc se utilizó como molde en reacciones de PCR para determinar la expresión del RNAm de la PRL o del RNAm constitutivo de la ciclofilina.

Las siguientes son las secuencias de los oligonucleótidos sentido y antisentido que se utilizaron para la amplificación del DNAc de hPRL por PCR; PRL (5') 5'-GGG TTC ATT ACC AAG GCC ATC-3' localizado en el exón 3 del RNAm de PRL, y PRL (3') 5'-TTC AGG ATG AAC CTG GCT GAC-3' que corresponde con una parte de los exones 4 y 5 (Figura 3). Para normalizar la expresión del RNAm de la PRL, se usó como control de amplificación el DNAc producto de la retrotranscripción del RNAm de la proteína ubicua ciclofilina (CYC), utilizando los siguientes oligonucleotidos; CYC (5') 5'-CCC CAC CGT GTT CTT CGA CAT-3' y CYC (3') 5'-GCT GGT CTT GCC ATT CCT GGA-3'. Estos oligonucleótidos generaron en las muestras un producto de 276 pb para la PRL y de 453 pb para la CYC respectivamente. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial GIBCO/BRL.

La amplificación enzimática de los fragmentos específicos del DNAc de la PRL y la CYC, se efectuó utilizando 5  $\mu$ l de los productos de la transcripción reversa con una concentración final de 1.5 mM de solución 10X con  $MgCl_2$ , 0.4  $\mu$ mol/L de cada oligonucleótido, 40  $\mu$ mol/L de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP's: dCTP, dATP, dGTP, dTTP), 4% de dimetil sulfóxido (SIGMA), y 2.4 U de Taq DNA polimerasa (Roche), en un volumen final de 25  $\mu$ l. La amplificación se efectuó en el termociclador automatizado Perkin-Elmer 2400. Se llevaron a cabo 35 ciclos de

PCR. Cada ciclo consistió en: la desnaturalización a 94<sup>0</sup>C por 1 min, el alineamiento a 58<sup>0</sup>C por 1 min y la extensión a 72<sup>0</sup>C por 1 min.

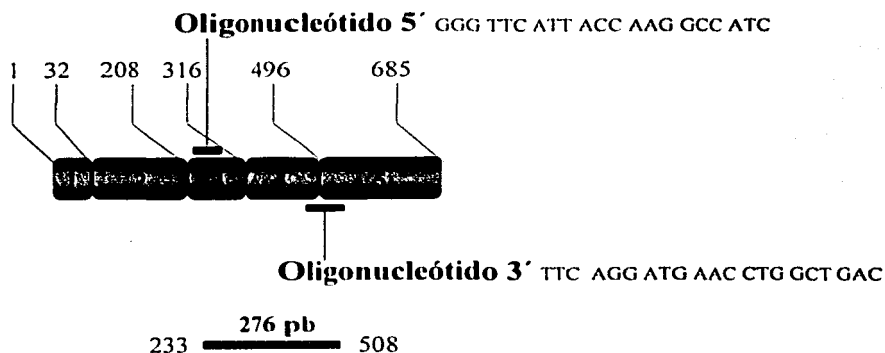


Figura 3. Las secuencia y posición de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del DNAc de la PRL. El oligonucleótido 5' está localizado en el exón 3 y el oligonucleótido 3' se encuentra localizado entre los exones 4 y 5 del gen de la PRL para eliminar el riesgo de que el producto de PCR sea contaminado con DNA genómico.

#### d) Electroforesis en gel de agarosa y transferencia por capilaridad

Los productos de PCR de PRL y CYC se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, en solución de corrida TBE 0.5X. Y se revelaron con tinción de bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases apiladas del DNA. El DNAc de las muestras se procesó simultáneamente con el marcador de peso molecular DNA escalera de 100 pb (GIBCO/BRL). Agua bidestilada se utilizó como control de PCR en ausencia de DNA molde y RNA se utilizó como control negativo de



RT-PCR en ausencia de RT. Las bandas de los DNAc obtenidos se observaron con radiación UV en un transiluminador.

Posteriormente, el gel se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon, Hybon-N+ (Amersham) en solución SSC 10X (NaCl 1.5 M, citrato de sodio dihidratado 0.15 M) durante toda la noche. Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana de nylon por radiación con luz UV y posteriormente la membrana se hibridó con una sonda de PRL marcada con digoxigenina (PRL-DIG) o con una sonda de ciclofilina marcada con digoxigenina (CYC-DIG) según los oligonucleótidos utilizados en el PCR.

### **e) Southern blot**

Un producto de DNAc específico de 276 pb se confirmó hibridando las membranas con una sonda de PRL marcada con digoxigenina (PRL-DIG) por análisis de Southern blot, que representa una herramienta muy efectiva para el reconocimiento o confirmación el DNA amplificado en la muestra.

#### **e1) Síntesis de la sonda PRL-DIG**

La sonda de PRL marcada con digoxigenina (PRL-DIG) se generó a partir de plásmido PBR322-hPRL, mediante PCR, utilizando el estuche comercial PCR DIG Probe Syntesis (Roche). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador automatizado Perkin-Elmer 2400. Los ciclos consistieron en: la desnaturalización a 94 °C por 2 min, 10 ciclos con incubaciones a 94°C por 15 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 2 min, seguido por 20 ciclos con incubaciones a 94°C por 15 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 5 min y finalmente una incubación a 72°C por 7 minutos.

Posteriormente la sonda PRL-DIG se purificó siguiendo el protocolo de la casa comercial QIAGEN, mediante el estuche comercial QIAquick® Spin.

## **c2) Reconocimiento del DNAc de PRL mediante hibridación y detección inmunológica**

La membrana de nylon con los fragmentos transferidos se prehibridó en solución estándar de hibridación (SSC 5X, N-Laurilsarcosina 0.1%, SDS 0.02% y reactivo de bloqueo al 1.6 % (Roche) a 68<sup>0</sup>C, durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se hibridó con la sonda específica de PRL-DIG previamente desnaturalizada a 97<sup>0</sup>C durante 10 minutos, en la misma solución de prehibridación a 60<sup>0</sup>C durante 24 h. Después la membrana se lavó 2 veces en solución de lavado 1 (SSC 2X, SDS 0.1 %) a temperatura ambiente y agitación constante durante 15 minutos seguida por 4 lavados a 68<sup>0</sup>C en solución de lavado 2 (SSC 0.1 X, SDS 0.1 %) con agitación constante durante 15 minutos.

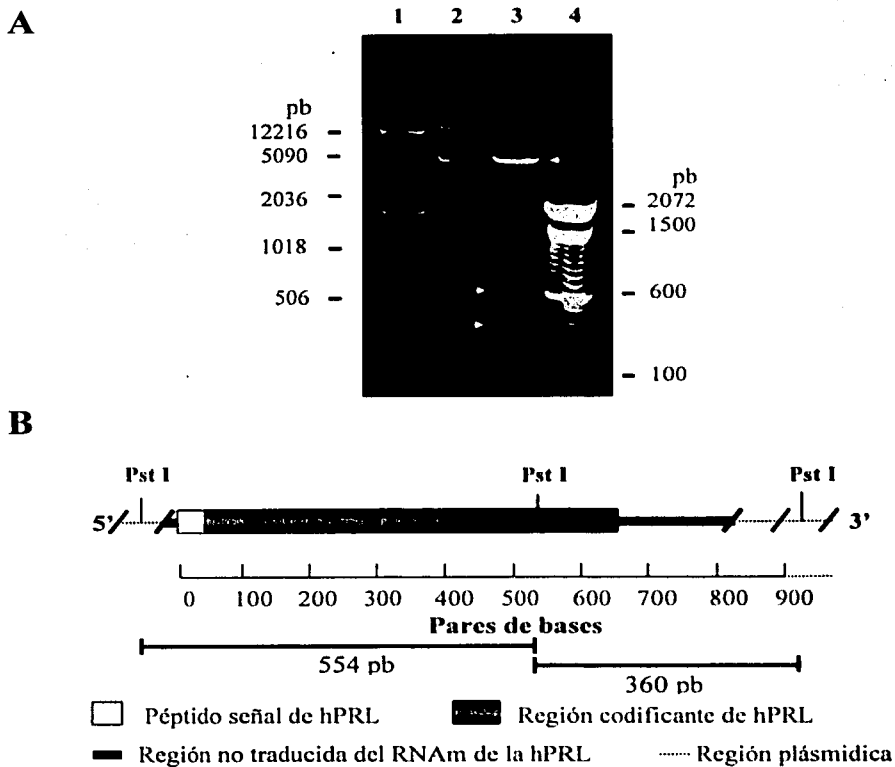
La detección inmunológica se realizó con incubaciones continuas de la membrana durante 5 minutos en solución de lavado 3 (Solución de ácido maleico con 0.3% de Tween 20 (v/v))y después durante 45 minutos con solución de bloqueo 1X (Roche). Posteriormente, la membrana se incubó durante 45 minutos con anticuerpo anti-DIG 75mU/ml diluido 1:10,000 en solución de bloqueo 1X (Roche), que está acoplado a fragmentos Fab de la enzima fosfatasa alcalina. Enseguida, la membrana se lavó 2 veces durante 15 minutos en solución de lavado 3 y una vez durante 5 minutos en solución de detección (Roche). Terminados los lavados, la membrana se incubó con revelador CSPD® (Roche) diluido 1:500 en solución de detección durante 5 min, que es desfosforilado por la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo lo que produce quimioluminiscencia. Posteriormente, se eliminó el

exceso de CSPD® y se incubó nuevamente la membrana a 37<sup>0</sup>C durante 20 minutos. Finalmente, la membrana se expuso en una película de Rayos X durante 20 a 30 minutos y se reveló. La densitometría de las bandas obtenidas se midieron en el analizador de imágenes Eagle Eye y los datos se analizaron mediante la prueba estadística de t pareada (n=11).

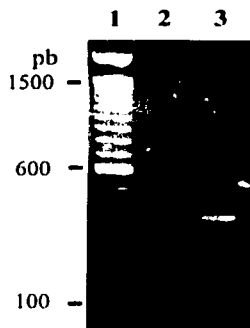
### **Obtención del plásmido pBR322-hPRL y la sonda purificada de PRL**

Mediante la transformación de células *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$ , se obtuvo el plásmido pBR322 conteniendo el DNAC que codifica para la prolactina humana (hPRL) denominado pBR322-hPRL. Posteriormente, el plásmido pBR322-hPRL se purificó por la técnica de midipreparación (Figura 4A, carril 2). Dicho plásmido se utilizó para la obtención de una sonda purificada de hPRL que se empleó como control positivo en el procesamiento de las muestras de RT-PCR de las células mononucleares (CMN). Para corroborar el inserto de 914 pb del gen de la hPRL en el plásmido, se realizó un corte con la enzima de restricción Pst I. En la Figura 4B se esquematizan los sitios de restricción a Pst I en el plásmido pBR322-hPRL. El corte enzimático generó 2 fragmentos de talla esperada de 360 y 554 pb (Figura 4A, carril 3), previamente reportados por Cooke y colaboradores (Cooke NE et al, 1981) (Figura 4B) y un fragmento plasmídico de aproximadamente 4361 pb (Figura 4A, carril 3)

A partir del plásmido pBR322-hPRL se obtuvo una sonda específica de hPRL de 276 pb por PCR, y se utilizó como control positivo en el análisis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR generados del RNAm de las CMN (Figura 5, carril 2). Adicionalmente, a partir del mismo plásmido se obtuvo una sonda de PRL marcada con digoxigenina (PRL-DIG), donde la adición de la digoxigenina le dio una mayor talla al DNA (Figura 5, carril 3). La PRL-DIG se utilizó para la hibridación en el Southern blot de los DNAC blanco generados por RT-PCR de las CMN.



**Figura 4.** Análisis en gel de agarosa al 1% de la amplificación y corte enzimático del plásmido pBR322-hPRL, y sitios de restricción de Pst I en el mismo plásmido. Panel A, las bandas fueron reveladas con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de DNA escalera de 1 kb (GIBCO/BRL); carril 2, plásmido pBR322-hPRL de 5275 pb obtenido por las técnica de midipreparación; carril 3, corte enzimático del plásmido con Pst I, donde se obtuvieron el fragmento del plásmido pBR322 de 4361 pb y dos fragmentos de 360 y 554 pb; carril 4, marcador de DNA escalera de 100 pb (GIBCO/BRL). Panel B, esquema de los sitios de restricción de la enzima Pst I en la secuencia del plásmido pBR322-hPRL.



**Figura 5. Análisis en gel de agarosa al 1% de la sonda de hPRL purificada y de la misma sonda marcada con digoxigenina (PRL-DIG). Carril 1, marcador de DNA escalera de 100 pb (GIBCO/BRL); carril 2, sonda purificada de PRL de 276 pb; carril 3, sonda de PRL marcada con digoxigenina.**

### **Características clínicas de los grupos control y con lupus eritematoso generalizado**

Se estudiaron 2 grupos: un grupo control, conformado por 19 mujeres sanas con una edad promedio de  $27.7 \pm 5.8$  años y un grupo de 14 mujeres con lupus eritematoso generalizado (LEG) con una edad promedio de  $31.5 \pm 6.0$  años. Ambos grupos estuvieron formados por mujeres con ciclos menstruales regulares, en edad reproductiva, sin trastornos endocrinológicos, sin tratamiento hormonal ni inmunosupresor. Todas las mujeres estaban en la fase folicular temprana del ciclo menstrual (entre los días 5 y 7) al momento del estímulo antidopaminérgico. La actividad clínica de la enfermedad fue valorada en un rango de 1 a 10 puntos en la escala del índice MEXSLEDAI, donde un valor mayor de 2 fue considerada activa. De acuerdo al criterio anterior se incluyeron 3 pacientes con actividad clínica de LEG.

### **Secreción de la PRL por las CMN con y sin estímulo de Con A.**

Las CMN obtenidas en el tiempo basal se incubaron en ausencia (no Con A) o presencia de Conavalina A (Con A). La Con A se utilizó con la finalidad de potenciar la respuesta, ya que la secreción basal de PRL por las CMN es muy baja. La PRL secretada al medio de cultivo se valoró mediante el bioensayo Nb2.

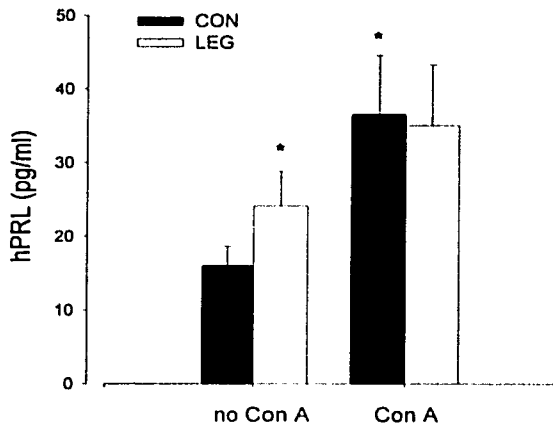
La secreción de la PRL por las CMN no estimuladas con Con A en el grupo con LEG fue significativamente mayor con respecto a la secreción de la PRL por las CMN no estimuladas con Con A del grupo control (Figura 6). El uso de la Con A incrementó significativamente la secreción de la PRL sólo por las CMN del grupo control ( $P < 0.05$ ). Aunque la secreción de PRL por las CMN del grupo con LEG aumentó después de la estimulación con Con A, ésta no fue significativamente diferente con respecto a la secreción de PRL por las células del grupo control también estimuladas con Con A (Figura 6).

### **Secreción de la PRL por las CMN en respuesta a metoclopramida**

Con el objeto de determinar la posible influencia de la dopamina en la secreción de la PRL por las CMN, las células obtenidas en el tiempo basal (0') y 90 minutos después del bloqueo dopaminérgico (90') *in vivo* de mujeres control y mujeres con LEG, se mantuvieron en cultivo en ausencia (no Con A) o presencia de Con A. La PRL secretada al medio de cultivo se cuantificó mediante el bioensayo Nb2.

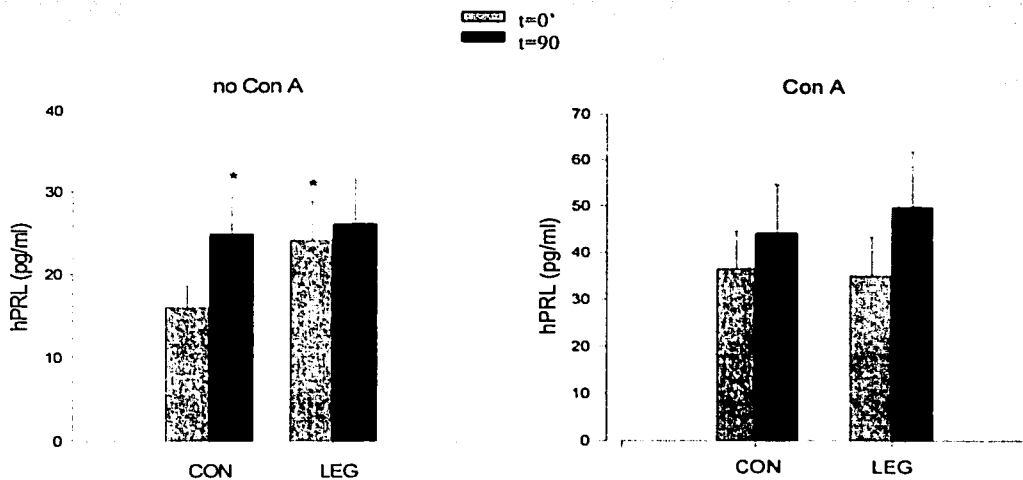
La secreción de la PRL por las CMN aumentó significativamente en respuesta al estímulo con el agente antidopaminérgico sólo en el grupo control, no así en el grupo con LEG donde la secreción no se modificó, en condiciones sin estímulo mitogénico (Figura 7 no Con A).

En presencia de la Con A el estímulo antidopaminérgico no modificó de manera significativa la secreción de la PRL por las CMN en ambos grupos (Figura 7 con Con A).



**Figura 6. Secreción de la PRL basal por células mononucleares del grupo control (CON) y grupo con LEG.** Las células mononucleares (CMN) de mujeres sanas y con LEG fueron mantenidas en cultivo en medio libre de sueros a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en ausencia (no Con A) o presencia de 4.0  $\mu\text{g/ml}$  de Concanavalina A (Con A). La secreción de PRL por las CMN se cuantificó mediante el bioensayo Nb2. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EE de cada grupo. \* $P < 0.05$  vs control no Con A.





**Figura 7. Secreción de la PRL por las CMN en respuesta al bloqueo dopaminérgico con metoclopramida.** Las CMN fueron obtenidas en el tiempo basal (0') y 90 min después del bloqueo dopaminérgico (90') de mujeres control (CON) mujeres con LEG. Las CMN fueron mantenidas en cultivo en ausencia (no Con A) o presencia de estímulo mitogénico (Con A). La secreción de la PRL se valoró mediante el bioensayo Nb2. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EE de cada grupo. \* $P < 0.05$  vs  $t=0'$  del grupo control no Con A.

### **Expresión del RNAm de la PRL en CMN del grupo control y del grupo con LEG.**

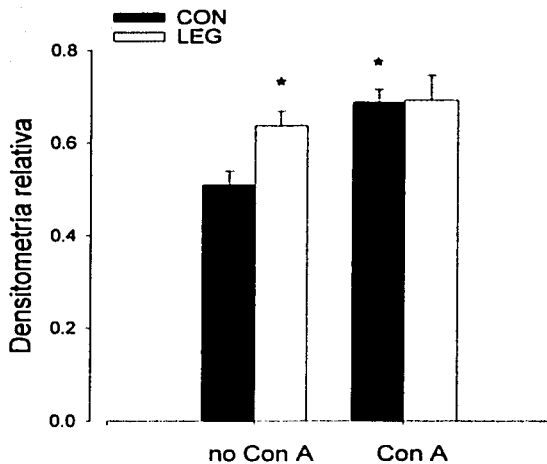
La expresión del RNAm de la PRL en las CMN se evaluó al término del cultivo. Las CMN obtenidas de los grupos control y LEG se mantuvieron en cultivo en ausencia (no Con A) o presencia de Con A. El RNA extraído de las células se procesó por RT-PCR y Southern blot.

La expresión del RNAm de la PRL se valoró mediante la densitometría de las bandas de PRL que fueron normalizadas contra la densitometría de las bandas del RNAm constitutivo de la ciclofilina. La expresión del RNAm de la PRL por las CMN no estimuladas mitogénicamente del grupo con LEG fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en comparación a la expresión del RNAm de la PRL por las CMN no estimuladas mitogénicamente del grupo control (Figura 8). En ambos grupos, la expresión del RNAm de la PRL aumentó en respuesta a la estimulación mitogénica con Con A, sin embargo, el aumento fue estadísticamente significativo sólo en el grupo control (Figura 8).

### **Expresión del RNAm de la PRL en CMN en respuesta a la metoclopramida**

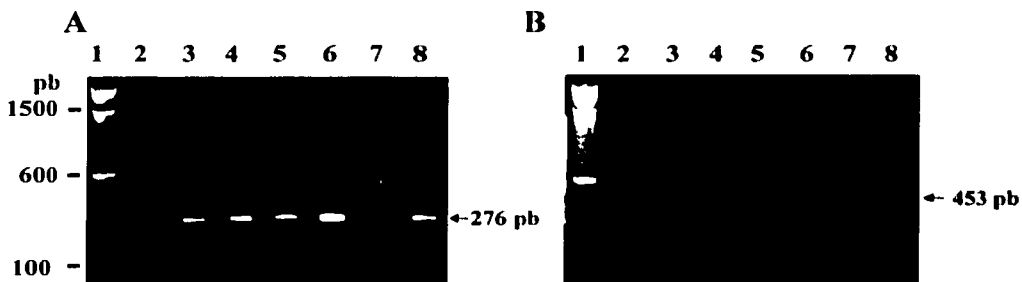
Con el objeto de determinar la posible influencia del sistema dopaminérgico en la expresión del RNAm de la PRL en las CMN, las células se obtuvieron en el tiempo basal (0') y 90 minutos después del estímulo con metoclopramida (90') *in vivo* del grupo control y del grupo con LEG. Las CMN obtenidas se mantuvieron en cultivo en ausencia (no Con A) o presencia (Con A) de estímulo mitogénico. Las técnicas de RT-PCR y Southern blot se utilizaron para determinar la expresión del RNAm de la PRL en las CMN. El RNA total extraído de las CMN fue usado como molde para la síntesis de la 1a cadena de DNAc por retrotranscripción. El DNAc se

amplificó por PCR con iniciadores específicos del gen de la PRL y la ciclofilina (Figura 3).



**Figura 8. Expresión basal del RNAm de la PRL por las CMN en el grupo control y en el grupo con LEG.** Las CMN fueron mantenidas en cultivo en ausencia (no Con A) o presencia de Con A. La expresión del RNAm de la PRL de las CMN se valoró mediante RT-PCR y Southern blot. La densitometría de las bandas de la PRL fue normalizada con la densitometría de las bandas del RNAm constitutivo de la ciclofilina. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EE de cada grupo. \* $P < 0.05$  vs  $t=0'$  control no Con A

Los productos de RT-PCR amplificados correspondientes a la PRL y la ciclofilina se separaron en geles de agarosa al 1%. Las bandas observadas correspondían a productos del tamaño esperado de 276 pb para PRL (Figura 9A) y 453 pb para ciclofilina (figura 9B). Con este análisis se observó el aumento en la abundancia de la banda de la PRL a los 90 minutos del bloqueo dopaminérgico en CMN no estimuladas con Con A (Figura 9A, carriles 3 y 4). En CMN estimuladas con Con A no hubo diferencia significativa en respuesta a metoclopramida (Figura 9, panel A, carriles 5 y 6).

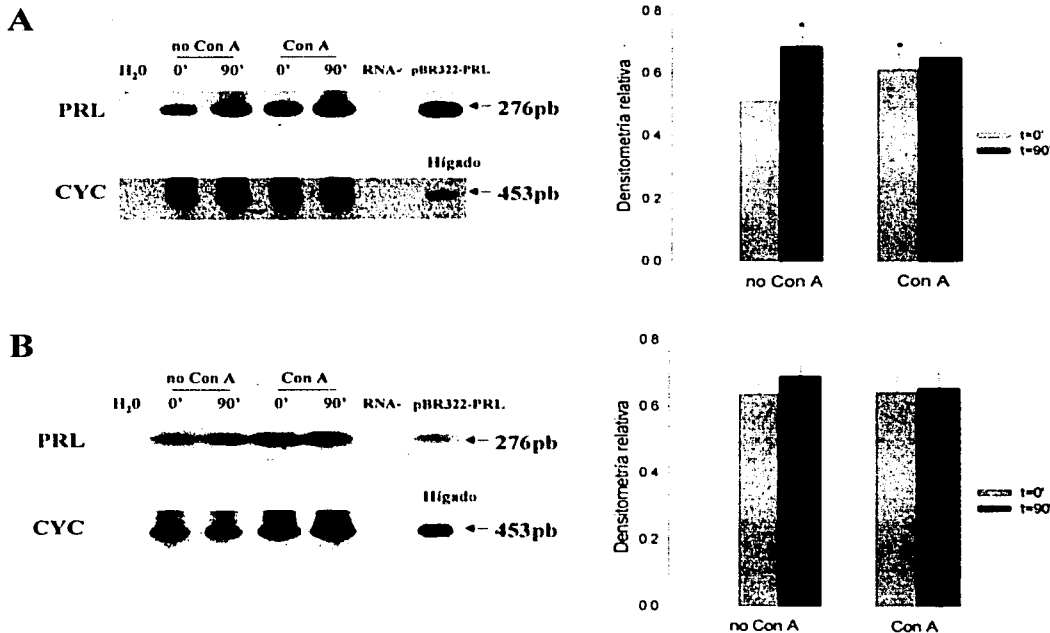


**Figura 9.** Análisis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados de DNAc correspondientes a la PRL (panel A) y la ciclofilina (panel B) de las CMN. Carril 1, marcador de DNA escalera de 100 pb (GIBCO/BRL); carril 2, H<sub>2</sub>O bidestilada que fue usada como control de ausencia de DNA molde; carril 3, CMN obtenidas al t=0' no estimuladas Con A en el cultivo; carril 4, CMN obtenidas al t=90' no estimuladas Con A en el cultivo; carril 5, CMN obtenidas al t=0' estimuladas con Con A en el cultivo; carril 6, CMN obtenidas al t=90' estimuladas con Con A en el cultivo; carril 7, control negativo de RNA en ausencia de la enzima retrotranscriptasa y procesado por PCR; carril 8A, sonda purificada de PRL obtenida del plásmido pBR322-hPRL y carril 8B sonda purificada de ciclofilina. La talla de los fragmentos fueron de 276 pb para la PRL y de 453 pb para la ciclofilina como lo señalan las flechas.

Para la confirmación de los productos de RT-PCR separados en geles de agarosa, éstos se transfirieron a membranas de nylon que se hibridaron con las sondas específicas de PRL-DIG y CYC-DIG respectivamente. En la figura 10 se observa un Southern blot representativo del análisis de los productos de RT-PCR obtenidos de las CMN del grupo control (panel A) y del grupo LEG (panel B) estimuladas y no estimuladas con Con A. En este análisis se confirmó específicamente un fragmento de 276 pb correspondiente a la PRL que fue generado a partir del DNAc de las CMN del grupo control y LEG. Este fragmento tenía un tamaño idéntico al obtenido con el DNAc de la sonda de hPRL usada como control positivo (Figura 10A). La expresión del gen de la PRL se determinó por la densitometría de las bandas del gen de la PRL que fueron normalizadas con la densitometría de las bandas del gen constitutivo de la ciclofilina (CYC). En las muestras procesadas en ausencia de la enzima transcriptasa reversa, ninguno de los DNAc de LEG y control dieron origen a productos de retrotranscripción. Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizó agua bidestilada (Figura 10).

La expresión del RNAm de la PRL en las CMN sin estímulo mitogénico aumentó posterior al bloqueo dopaminérgico en el grupo control (Figura 10, panel A) no así en el grupo con LEG donde la expresión del RNAm de la PRL no se modificó (Figura 10, panel B).

En respuesta al estímulo mitogénico con la Con A, la expresión del gen de la PRL por las CMN no se modificó de forma significativa ni en el grupo control (Figura 10A) ni en el grupo con LEG (Figura 10B) con respecto a la expresión de las CMN obtenidas en el tiempo basal también estimuladas con Con A .



**Figura 10. La expresión del RNAm de la PRL por las CMN del grupo control y del grupo con LEG en respuesta a metoclopramida.** La expresión del RNAm de la PRL se analizó por RT-PCR y Southern blot de las CMN obtenidas en el tiempo basal (0') y 90 min después de la administración de metoclopramida (90') a las mujeres control (panel A) y con LEG (panel B). Las CMN fueron mantenidas en cultivo en ausencia (no Con A) o presencia de Con A. Los productos de PCR del plásmido pBR322-hPRL e higado fueron utilizados como control positivo, para la PRL y ciclofilina, respectivamente utilizando oligonucleótidos específicos. Agua bidestilada se utilizó como control de PCR en ausencia de DNA molde y RNA se utilizó como control negativo de RT-PCR en ausencia de RT. Los productos de PCR amplificados de la PRL y la ciclofilina se hibridaron con una sonda específica marcada con digoxigenina. La densitometría de las bandas de PRL fueron normalizadas con la densitometría de las bandas de la ciclofilina (CYC). \* $P < 0.05$  vs  $t=0'$  control no Con A.

## DISCUSIÓN

---

La regulación neuroendócrina de la síntesis y secreción de la prolactina (PRL) hipofisaria está fundamentalmente bajo la inhibición tónica hipotalámica, que es ejercida principalmente por la dopamina a través del eje portal hipotálamo-hipofisario (Larrea F et al, 1993; Neill D et al, 1994; Nira BJ et al, 1996; Freeman ME et al, 2000). Adicionalmente, la PRL por sí misma modifica la actividad dopaminérgica del hipotálamo, regulando tanto la síntesis como la secreción de dopamina por un mecanismo de retroalimentación de asa corta (Perkins NA et al, 1979). Sin embargo, los mecanismos que regulan la síntesis de la PRL de origen linfocitario aún no se han establecido. En el presente estudio se demostró que la administración por vía oral de un agente antagonista dopaminérgico, la metoclopramida, a mujeres en edad reproductiva incrementó tanto la secreción como la expresión del gen de la PRL por las células mononucleares (CMN) obtenidas de sangre venosa.

En años recientes, el estudio de la influencia de la PRL en el sistema inmunológico ha generado gran interés. La PRL se sintetiza y secreta en células del sistema inmunológico como los linfocitos (Sabharwal P et al, 1992), los esplenocitos y los timocitos, entre otros, en los que además, la PRL estimula su proliferación y mitogénesis. Aunado a lo anterior, la presencia de receptores de tipo D<sub>3</sub> y D<sub>5</sub> de la dopamina en la membrana de los linfocitos, y la síntesis de algunas catecolaminas como la dopamina en estas mismas células (Bergquist J et al, 1994), sugiere mecanismos de regulación autocrina sobre la síntesis de la PRL.

Dentro de las diversas patologías que afectan la regulación inmunológica, se encuentran fenómenos autoinmunes generalizados que se caracterizan por la

presencia de autoanticuerpos contra diversos antígenos propios. El lupus eritematoso generalizado (LEG) es la enfermedad cuya patogénesis puede afectar simultáneamente a piel, articulaciones, riñón, serosas, sistema nervioso, órganos hematopoyéticos, pulmones y corazón. Se sabe que el LEG es más frecuente en mujeres embarazadas y en edad reproductiva que en hombres, lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden tener un papel importante que contribuya a la enfermedad. Reportes previos han demostrado que aproximadamente el 30% de los pacientes con LEG cursan con hiperprolactinemia y que existe una alta correlación con la actividad de la enfermedad (Jara JL et al, 1992; Neidhart M, 1996; Jacobi AM et al, 2001). Sin embargo, esta última evidencia es controversial ya que otros autores han informado que no existe correlación alguna entre la hiperprolactinemia y la actividad de la enfermedad en los pacientes con LEG (Pauzner R et al, 1994; Buskila D et al, 1996; Jimena P et al, 1998). Por otra parte, se ha propuesto que un agente agonista dopaminérgico, la bromocriptina, puede ser usado en el tratamiento de la enfermedad con la finalidad de disminuir las concentraciones circulantes de la PRL (Walker SE, 2001), lo que resulta en una disminución de la actividad autoinmune del LEG. Cuando los pacientes con LEG abandonan el tratamiento con bromocriptina el proceso autoinmunitario se exagera severamente (Compañ-González D et al, 1996).

Los resultados de este estudio demuestran que las CMN mantenidas en cultivo de pacientes con diagnóstico de LEG, secretan mayor cantidad de PRL basal mayor que las CMN de sujetos normales, lo que apoya reportes previos (Gutiérrez MA et al, 1995; Larrea F et al, 1997). Adicionalmente, se observó que las CMN estimuladas *in vitro* con Concavalina A (Con A) secretaron altas concentraciones de PRL en el grupo control y el grupo con LEG. Sin embargo, sólo en el grupo control se encontró que la secreción de PRL en respuesta a la Con A era



significativamente mayor en comparación a CMN no estimuladas. Estos datos sugieren que la PRL es sintetizada por las CMN y que la activación de las células por la Con A es un mecanismo para estimular mayor secreción de PRL. Además, estos resultados coinciden con estudios previos que demuestran que algunos mitogénos como la fitohemaglutinina y la misma Con A tienen influencia en la secreción de la PRL (Montgomery et al, 1990; Sabharwal et al, 1992). En el grupo con LEG, el estímulo mitogénico de la Con A no modificó la secreción de la PRL en las CMN en comparación a las CMN no estimuladas. Esto puede deberse a que las células provengan ya activadas de un entorno propicio como parte de la enfermedad, lo que provoca la secreción de PRL basal aumentada y la falta de respuesta a la Con A *in vitro*.

Las CMN obtenidas previo y posterior al bloqueo dopaminérgico se incubaron en ausencia o presencia de Con A. En ausencia de la Con A, se demostró el aumento significativo en la secreción de PRL en los cultivos de las CMN en respuesta al estímulo con el agente antidopaminérgico, sólo en el grupo control. En el grupo con LEG, la secreción de PRL por las CMN en cultivo no se modificó en respuesta al estímulo con el agente antidopaminérgico. La presencia de la Con A en los cultivos de las CMN no modificó la secreción de la PRL de manera significativa en respuesta al estímulo con el agente antidopaminérgico, ni en el grupo control ni el grupo con LEG. Los datos sugieren que probablemente las CMN de estas pacientes con LEG se encuentran en un estado de activación dado por la enfermedad y se pierde el efecto tanto de la metoclopramida como de la Con A. Otra posibilidad es que, en personas con LEG, alguno de los mecanismos que se desencadenan para la transducción de la señal posterior a la interacción de la dopamina con su receptor se encuentre alterado, impidiendo que la dopamina ejerza su acción sobre la secreción de la PRL. En el grupo control, donde las CMN se encuentran en ausencia de

trastornos inmunológicos se demostró que el sistema dopaminérgico tiene influencia sobre la regulación de la secreción de la PRL. En el grupo con LEG donde las CMN están afectadas, la regulación por el sistema dopaminérgico se encuentra modificada.

En este estudio se demostró que la expresión del RNAm de la PRL en las CMN mantenidas en cultivo se encuentra aumentada en mujeres con diagnóstico de LEG en comparación a la expresión en las CMN de mujeres normales. Adicionalmente, se observó que la expresión del RNAm de la PRL de las CMN estimuladas *in vitro* con la Con A aumentó en el grupo control y en el grupo con LEG. Sin embargo, sólo en el grupo control se observó que la expresión del RNAm de la PRL fue significativamente mayor en respuesta a la Con A en comparación a la expresión del RNAm de la PRL en las CMN no estimuladas mitogénicamente.

Las CMN obtenidas previo y posterior al bloqueo con el agente antidopaminérgico administrado *in vivo* se incubaron en ausencia o presencia de Con A. El agente antidopaminérgico provocó el aumento en la expresión del RNAm de la PRL en las CMN no estimuladas con Con A, sólo en el grupo control. En el grupo con LEG la expresión del RNAm de la PRL no se modificó en respuesta al estímulo antidopaminérgico. La presencia de la Con A provocó el aumento en la expresión del RNAm de la PRL en ambos grupos, pero no modificó de manera significativa la expresión del RNAm de PRL posterior al bloqueo dopaminérgico con la metoclopramida. Similar a lo que ocurre con la secreción de la PRL por las CMN, la expresión del RNAm de la PRL en estas células de pacientes con LEG no responden al estímulo con el agente antidopaminérgico y a la Con A porque provienen de un medio en el cual están ya activadas por el trastorno inmunológico que presenta.

Diversos estudios han demostrado la expresión del RNAm de la PRL en células del sistema inmunológico, lo que implica que la PRL es sintetizada localmente (DiMattia GE et al, 1988, Shan GN et al, 1990; Sabharwal P et al, 1992; Wu H et al, 1996; Larrea F et al, 1997). La transcripción del gen de la PRL en estas células es regulada directamente por un promotor alterno, produciendo localmente una molécula de PRL con funciones de citocina. El transcrito extrahipofisario es 134 pb más largo que el hipofisario debido a que el RNAm de la PRL presenta un exón adicional no codificante, el cual sufre un empalme alternativo con el exón 1. Ambos transcritos, tanto el hipofisario como el extrahipofisario, generan un producto de traducción idéntico. La expresión del gen de la PRL en tejidos extrahipofisarios a diferencia de la hipofisaria, es independiente del factor de transcripción Pit-1 (Berwaer et al, 1994) debido a la presencia del promotor alterno. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen de la PRL en las células del sistema inmunológico humano no han sido dilucidados.

En la hipófisis, la dopamina regula la síntesis de la PRL a través de la unión a su receptor. Este receptor se encuentra acoplado a proteínas G inhibitorias que suprimen una respuesta celular dependiente de AMPc. Después del suceso inicial de la formación de AMPc a partir de ATP por acción de la adenilato ciclasa, el AMPc a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA), que fosforila en residuos de serina o treonina a la proteína de unión dependiente de AMPc (CREB). El CREB ya fosforilado, se une al factor de transcripción Pit-1 que regula la transcripción del gen de la PRL. Pit-1 es el principal regulador de la transcripción de PRL a nivel hipofisario.

En la región proximal del promotor del gen de la PRL extrahipofisaria se ha encontrado un elemento de respuesta que regula parcialmente la respuesta por AMP

cíclico (CRE) (Liang J et al, 1992). La activación de la transcripción del gen de PRL por el promotor alterno en las células T, dada tanto por AMPc como por activadores de células T como la fitohemaglutinina, es particularmente dependientes de CRE, lo implica que una proteína de unión a CRE (CREB) o algún miembro de esta familia esta relacionada en la expresión del gen de la PRL linfocitaria. Adicionalmente, reportes previos han señalado que la transcripción linfocitaria del gen de PRL es independiente de Pit-1 (Berwaer et al, 1994), pero que CREB modifica la expresión del gen de la PRL. De acuerdo a los resultados de la presente tesis, el sistema dopaminérgico tiene influencia sobre el gen de la PRL en las CMN, al igual que en la hipófisis. La dopamina posiblemente tenga influencia directa sobre la expresión del gen de la PRL a través de la activación de CRE. Quedaría por dilucidar a través de que moléculas se está regulando la transcripción del gen de PRL.

En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que existen mecanismos de regulación de la PRL por el sistema dopaminérgico a nivel inmunológico de manera similar a lo que ocurre a nivel hipofisario, y que esta regulación está alterada en condiciones de autoinmunidad. Con base en estos hallazgos, queda por explorar la participación de la dopamina en la regulación de la síntesis y la secreción de la PRL linfocitaria en estados normales y de autoinmunidad como el lupus eritematoso generalizado.

## **CONCLUSIONES**

---

- La secreción y la expresión basal del RNAm de la prolactina (PRL) linfocitaria es mayor en el lupus eritematoso generalizado (LEG) que en condiciones normales.
- El sistema dopaminérgico participa en los mecanismos de regulación de la PRL en el sistema inmunológico.
- Los resultados del presente estudio sugieren la presencia de modificaciones en la regulación de la secreción y la expresión del gen de la PRL linfocitaria en condiciones de autoinmunidad como el LEG.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12912-12916.
- Berwaer M, Martial JA, Davis JRE. Characterization of an upstream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 635-642.
- Bondy B, De Jonge S, Pander S, Primbs J, Ackenheil M. Identification of dopamine D4 receptor mRNA in circulating human lymphocytes using nested polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol* 1996; 71: 139-144.
- Burris TP, Nguyen DN, Smith SG, Freeman MC. The stimulatory and inhibitory effects of dopamina on prolactin secretion involve different G-proteins. *Endocrinology* 1992; 130: 926-932.
- Buskila D, Lorber M, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erithematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 629-632.
- Caronti B, Calderaro C, Passarelli F, Palladini G, Pontieri FE. Dopamine receptor mRNA in the rat lymphocytes. *Life Sci* 1998; 62: 1919-1925.
- Chomczynski P, Sachi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Compañ-González D, Martínez-Aguilar NE, Vargas-Camaño ME, Guido-Bayardo R. Hiperprolactinemia y autoinmunidad. *Rev Alerg Mex* 1996; 43: 128-132.

- Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. Human Prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* 1981; 256: 4007-4016.
- Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T, Bach JF. Neuroendocrine control of thymic hormonal production: prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* 1989; 129: 983-990.
- Delidow BC, Billis WM, Agarwal P, White BA. Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-beta in GH3 cells. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1716-1722.
- Demaria JE, Nagy GM, Lerant AA, Fekete MIE, Levenson CW, Freeman ME. Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin. *Endocrinology* 2000; 141: 366-374.
- Devost D, Boutin JM. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158: 99-109.
- Dimattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 1988; 122: 2508-2517.
- Elbourne KB, Keisler D, McMurray RW. Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998; 7: 420-427.
- Ferreira C, Paes M, Gouveia A, Ferreira E, Pádua F, Fiúza T. Plasma homovanillic acid and prolactin in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998; 7: 392-397.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev* 2000; 80: 1523-1631.

- Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 356-373.
- Gourdj D, Laverriere JN. The rat prolactin gene: a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 100: 133-142.
- Gutiérrez MA, Molina JF, Jara LT, Cuéllar ML, García C, Gutiérrez-Ureña S, Gharavi A, Espinoza LR. Prolactin and systemic lupus erythematosus: prolactin secretion by SLE lymphocytes and proliferative (autocrine) activity. *Lupus* 1995; 4: 348-352.
- Jacobi AM, Rohde W, Ventz M, Riemekasten G, Burmester G-R, Hiepe F. Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity. *Lupus* 2001; 10: 554-561
- Jara LJ, Gomez-Sánchez C, Silveira LH, Martínez-Osuna P, Vasey F, Espinoza LR. Hiperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Am J Med Sci* 1992; 303: 222-226.
- Jara LJ, Lavalle V, Espinoza LR. Does prolactin have a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus? *J Rheumatol* 1992; 19: 1333-1335.
- Jimena P, Aguirre MA, López Curbelo A, de Andrés M, García-Courtay C, Cuadrado MJ. Prolactin levels in patients with systemic lupus erythematosus: a case controlled study. *Lupus* 1998; 7: 383-386.
- Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, Alarcón-Segovia D. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997; 82: 3664-3669.



- Larrea F, Méndez I, Cariño C, Díaz L. Conceptos actuales sobre fisiología de la prolactina: variantes moleculares y mecanismos de acción. *Rev Invest Clin* 1993; 45: 375-386.
- Lavalle C, Layo E, Paniagua R, Bermúdez JA, Herrera J, Graef A, González-Barcena D, Fraga A. Correlation study between prolactin and androgen in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14: 268-272.
- Leañós-Miranda A, Quintal-Alvarez MG, Cervera-Castillo H, Blanco-Favela F. Prolactina como inmunomodulador. *Rev Alerg Mex* 1997; 44: 116-123.
- Liang J, Kim KE, Schoderbek WE, Maurer RA. Characterization of a nontissue-specific, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the proximal region of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 885-892.
- Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci* 1996; 59: 599-614.
- McMurray R, Kleisler D, Kanuchel K, Izui S, Walker SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in female B/W mouse. *J Immunol* 1991; 147: 3780-3787.
- Montgomery DW, LeFevre JA, Ulrich ED, Adamson CR, Zukoski CF. Identification of prolactin-like proteins synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology* 1990; 127: 2601-2603.
- Montgomery DW, Shen GK, Ulrich ED, Steiner LL, Parrish PR, Zukoski CF. Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 1992; 131: 3019-3026.
- Montgomery DW. Prolactin production by immune cells. *Lupus* 2001; 10: 665-675.

- Mukherjee P, Marstro AM, Hymer WC. Prolactin induction of interleukin-2 receptors a rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 1990; 126: 88-94.
- Murdoch GH, Poter E, Nicolaisen AK, Evans RM, Rosenfeld MG. Epidermal growth factor rapidly stimulates prolactin gene transcription. *Nature* 1982; 300: 192-194.
- Nira BJ. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrin Rev* 1985; 6: 564-589.
- Nira BJ, Mershon JL, Allen DI, Steinmetz RW. Extrapituitary Prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrin Rev* 1996; 17: 639-669.
- Neidhart M. Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1996; 23: 476-481.
- Neill JD, Nagy GM. Prolactin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill JA. New York: Raven, 1994, p 1833-1860.
- Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB. The prolactin gene is located in chromosome 6 in humans. *Science* 1981; 212: 815-816.
- Puzner R, Urowitz MB, Gladman DD, Gough JM. Prolactin in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 629-632.
- Perkins NA, Westfall TC, Paul CV, MacLead R, Rogol AD. Effect of prolactin on dopamine synthesis in medial basal hypothalamus: evidence for a short loop feedback. *Brain Res* 1979; 160: 431-444.
- Pelligrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor en human lymphoid cells. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1023-1031.

- Reem GH, Ray DW, Davis JRE. The human prolactin gene upstream promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP. *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 285-293.
- Ricci A, Amenta F. Dopamine D5 receptors in human peripheral blood lymphocytes: a radioligand binding study. *J Neuroimmunol* 1994;53:1-7.
- Santambrogio L, Lipartiti M, Bruni A, Toso RD. Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1993; 45: 113-120.
- Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelley KW, Malarkey WB. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7713-7717.
- Shah GN, Laird HE, Russell DH. Identification and characterization of a prolactin-like polypeptide synthesized by mitogen-stimulated murine lymphocytes. *Int Immunol* 1991; 3: 297-304.
- Shurt PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* . 1995; 4: 425-437.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RI, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1058-1063.
- Sinha YN. Structural Variants of Prolactin: Occurrence and Physiological Significance. *Endocrin Rev* 1995; 16: 354-365.
- Stanley F. Stimulation of prolactin gene by insulin. *J Biol Chem* 1998; 263: 13444-13448
- Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* 1984; 3: 429-437.

- Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991; 129: 983-990.
- Walker SE. Treatment of systemic lupus erithematosus with bromocriptine. *Lupus* 2001; 10: 1997-2002.
- Wu H, Devi R, Malarkey WB. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology* 1996; 137: 349-353.

## Transformación de células competentes

### a) Medio de cultivo LB sólido (Luria Bertani )

10g peptona grado bacteriológico

5g extracto de levadura grado bacteriológico

10g NaCl

15g agar grado bacteriológico

Agua c.b.p. 1000 ml

Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH y se esterilizó en el autoclave.

### b) Solución de tetraciclina

### c) Medio de cultivo LB líquido

10 g peptona grado bacteriológico

5g extracto de levadura grado bacteriológico

10g NaCl

Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH

Se aforó con agua c.b.p. 1000 ml, se agregó el agar y se esterilizó en el autoclave

### d) *E. coli* cepa DH5 $\alpha$

### e) Glicerol

## Hibridación

### a) Solución estándar de hibridación

5X SSC

0.1% N-Laurilsarcosina

0.02% SDS

1.6% reactivo de bloqueo (Roche)

**b) Soluciones de lavado post-hibridación**

- 1) 2X SSC, 0.1% SDS
- 2) 0.1X SSC, 0.1% SDS

**Detección inmunológica**

**a) Solución de ácido maleico**

0.1 M Acido maleico

0.15 M NaCl

Se ajustó a pH 7.5 con NaOH

**b) Solución de lavado**

Solución de ácido maleico con 0.3% de Tween 20 (v/v)

**c) Solución de detección**

0.1 M Tris-HCl

0.2 M NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

Se ajustó a pH 9.5 con NaOH

**d) Solución de bloqueo 1X**

Dilución 1:10 de la solución de bloqueo 10 X (concentrado) en solución de ácido maleico.